

四药门花属及其近缘植物 ITS 区序列分析和系统学意义*

施苏华 黄椰林 章 群 金 虹 谈凤笑 张宏达

(中山大学生命科学院, 广州 510275)

摘要 测定和分析了四药门花等 13 种金缕梅科 (Hamamelidaceae) 植物的核糖体 DNA 转录间隔区 (ITS 区) 及 5.8S 编码区的序列。应用最大简约法构建的分子系统树表明: 被分析的金缕梅亚科 (Hamamelidoideae) 植物形成一个单系类群, 亚科内及其中的金缕梅族 (Hamamelideae) 内部呈复系演化 (polyphyletic) 的特征; 支持秀柱花族 (Eustigmateae) (含秀柱花属 *Eustigma*、牛鼻栓属 *Fortunearia* 和山白树属 *Sinowilsonia*) 成立以及将蚊母树族 (Distyliaceae) 与弗特吉族 (Fothergilleae) 合并的观点, 此结果与 Endress (1989) 系统接近; 金缕梅族中金缕梅属 (*Hamamelis*) 与弗特吉族中的弗特吉属 (*Fothergilla*)、银缕梅属 (*Shaniodendron*) 和水丝梨属 (*Sycopsis*) 系统发育关系密切; 四药门花属 (*Tetrathyrium*) 与槭木属 (*Loropetalum*) 属于同一个单系类群, 它们与 *Hamamelis* 的亲缘关系较远。

关键词 四药门花属, 金缕梅亚科, 系统发育, ITS 区, 核糖体 DNA

分类号 Q 943

Analysis of the ITS Sequences of Nuclear Ribosomal DNA from *Tetrathyrium* (Hamamelidaceae) and the Related Genera and the Phylogenetic Significance

SHI Su-Hua HUANG Ye-Lin ZHANG Qun JIN Hong TAN Feng-Xiao ZHANG Hong-Da
(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract The sequences of the ITS regions and 5.8S coding region of nuclear ribosomal DNA from the genus *Tetrathyrium* and the related genera of Hamamelidaceae were determined and analysed. Based on the ITS sequences, the phylogeny of Hamamelidoideae was reconstructed, which was similar to Endress' system of Hamamelidaceae in 1989. It was shown that all the species of the subfamily Hamamelidoideae formed a monophyletic group in this study. However within both Hamamelidoideae and the tribe Hamamelideae, the polyphyly was indicated in the MPTs. The monophyly of the tribe Eustigmateae was strongly supported (including *Eustigma*, *Fortunearia* and *Sinowilsonia*). The ITS data supported Endress' treatment of merging the tribe Distyliaceae and Fothergilleae too. It was suggested that the genus *Hamamelis* was closely related to Fothergilleae in this study. *Tetrathyrium* and *Loropetalum* formed a monophyletic group.

Key words *Tetrathyrium*, Hamamelidoideae, Phylogeny, ITS regions of ribosomal DNA

金缕梅科 (Hamamelidaceae) 是一个古老的、在被子植物起源与系统演化中具有重要

* 国家杰出青年科学基金 (39825104), 国家自然科学基金 (39970057) 和广东省自然科学基金 (970190) 资助项目
1998-10-07 收稿, 1998-11-30 接受发表

作用的关键科。全世界共 30~32 属约 140 种, 分布于热带及亚热带。长期以来, 有关金缕梅科的系统发育研究争议颇多。Harms (1930)、Bogle (1970)、张宏达 (1979) 和 Endress (1989) 等分别提出了各自的分类系统。金缕梅亚科 (Hamamelidoideae) 是金缕梅科中最复杂的、具有单胚珠、种系复杂而在近代获得较为良好发展的一个亚科, 包括 22 个属, 分属于 4 个族 (Endress, 1989), 其族间及其属间的系统发育关系也一直是金缕梅类研究的热点。近年来, 随着分子系统学研究的兴起与发展, 利用 DNA 序列分析来探讨金缕梅科系统发育的工作已有报道 (Shi *et al*, 1998; 李建华等, 1997)。然而, 在利用分子数据处理争议较大的金缕梅亚科内的系统演化关系上还有一些重要类群尚未涉及到。例如, 四药门花属 (*Tetrathyrium*) 是一个我国特有属, 在解剖学及形态学上被普遍认为是金缕梅亚科中最为原始的代表。过去曾被认为仅局限分布于香港, 80 年代后期在广西龙州和贵州荔波也发现其分布 (张宏达等, 1989)。该属形态学上的原始性状对研究金缕梅亚科的系统演化具有特别重要的意义, 而分子数据尚未报道。在本研究中, 我们首次测定了 *Tetrathyrium subcordatum* 的核糖体 DNA (nrDNA) 转录间隔区 (ITS 区) 序列数据, 结合其他相关类群, 应用序列同源性比较和分支分析方法探讨了金缕梅亚科内的系统发育关系。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究中采用 10 个样品代表金缕梅亚科内主要的类群, 3 个样品作为复合外群组。具体种类及来源见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 植物总 DNA 的提取与纯化 采用 CTAB 法 (Doyle *et al*, 1987) 提取样品的总 DNA, 并用玻璃粉进行纯化。

1.2.2 ITS 区片段的扩增与纯化 PCR 反应过程以及所用引物参照 Wen *et al* (1996)。PCR 扩增产物采用 Ultrafree - MC filters (Millipore) 进行纯化。

1.2.3 序列测定 采用双脱氧链终止法 (Sanger *et al*, 1979), 以 α -³⁵S-dATP 作为放射标记, 操作按 T7 DNA sequence version 2.0 Kit (Amersham) 说明书略加修改, 分别采用引物 N18L18、C5.8S、N5.8S、ITS4 从两个方向进行测序 (Wen *et al*, 1996), 得到整个 ITS 区及 5.8S 区的序列。测序反应产物用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离, 随后将胶转移到 3 mm Whatman 滤纸上, 移至普通烘箱, 50℃ 干燥 3 h 后压片, 放射自显影。

1.2.4 数据处理 所测序列采用 Clustal x 程序 (Thompson *et al*, 1997) 进行对位排列; PAUP 3.1.1 软件包 (Swofford, 1993) 在 Macintosh IIci 机上对序列进行统计分析和分支分析, 计算各类群间的核苷酸差异数及差异校正值 (Knuc 值), 采用最大简约法 (maximum parsimony method) 获得最大简约树 (MPTs); 应用自展法 (bootstrap) 检验系统树, 自展数据集为 100 次。分支分析中采用长柄双花木 (*Disanthus cercidifolius* var. *longipes*)、红花荷 (*Rhodoleia championii*) 和北美苏合香 (*Liquidambar styraciflua*) 作为复合外群组。

表 1 本研究所用金缕梅亚科和外类群的序列和样品来源 (* 示该样品为本研究所测)。按张宏达 1979 系统
Table 1 Accessions of Hamamelidoideae and the complex outgroup sampled for the ITS studies (* represent the samples which
were sequenced in this study). The classification system was based on H. T. Chang (1979)

Species	Subfamily	Voucher	Sequences and Geographical origin
<i>Disanthus cercidifolius</i> var. <i>longipes</i> 153*	Disanthoideae	R. Hao/974001	Cultivated in Zhongshan Botanical Garden, Nanjing, China
<i>Rhodoleia championii</i> 110*	Rhodoleioideae	F. Xing/6744	Da Wu Shan, Hong Kong, China
<i>Hamamelis mollis</i> 586	Hamamelidoideae	Y. Chen/586	Shi <i>et al</i> , 1998
<i>Fothergilla major</i> W48	Hamamelidoideae	J. Wen/48	Shi <i>et al</i> , 1998
<i>Shaniodendron subaequale</i> 151*	Hamamelidoideae	R. Hao /951004	Cultivated in Zhongshan Botanical Garden, Nanjing, China
<i>Sinowilsonia henryi</i> 156*	Hamamelidoideae	R. Hao/974003	Cultivated in Zhongshan Botanical Garden, Nanjing, China
<i>Tetrathyrum subcordatum</i> 218*	Hamamelidoideae	F. Xing/9271	Bowen Road, Hong Kong, China
<i>Loropetalum chinense</i> 65	Hamamelidoideae	X. Li/97004	Shi <i>et al</i> , 1998
<i>Fortunearia sinensis</i> 42	Hamamelidoideae	Y. Chen/42	Shi <i>et al</i> , 1998
<i>Corylopsis claborescens</i> 584	Hamamelidoideae	J. Wen/584	Shi <i>et al</i> , 1998
<i>Sycopsis sinensis</i> 102*	Hamamelidoideae	X. Li/97001	Cultivated in Zhongshan Botanical Garden, Nanjing, China
<i>Eustigma oblongifolium</i> 115*	Hamamelidoideae	F. Xing/6746	Da Wu Shan, Hong Kong, China
<i>Liquidambar styraciflua</i> 581	Liquidambaroideae	J. Wen/581	Shi <i>et al</i> , 1998

表 2 四药门花属及其近缘植物 ITS 区序列距离矩阵, 对角线下部为绝对距离; 对角线上部为 K_{nuc} 值; 缺失位点不参与比较

Table 2 Kimura two - parameter sequence divergence values of taxa in *Tetrathyrum* and its related genera of Hamamelidaceae.

Below the diagonal are the absolute distances; and above the diagonal are the Kimura two - parameter
distances. Gaps were eliminated from the comparison

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. <i>D. cercidifolius</i> var. <i>longipes</i>	-	0.221	0.250	0.243	0.250	0.291	0.273	0.283	0.286	0.265	0.253	0.282	0.312
2. <i>R. championii</i>	160	-	0.276	0.264	0.271	0.285	0.283	0.290	0.282	0.276	0.278	0.286	0.305
3. <i>H. mollis</i>	176	194	-	0.020	0.033	0.107	0.117	0.126	0.104	0.101	0.034	0.102	0.265
4. <i>F. major</i>	176	191	14	-	0.033	0.104	0.122	0.120	0.098	0.102	0.037	0.099	0.251
5. <i>S. subaequale</i>	181	196	23	24	-	0.119	1.111	0.123	0.109	0.112	0.021	0.110	0.247
6. <i>Sin. henryi</i>	210	206	75	75	86	-	0.166	0.169	0.042	0.147	0.122	0.042	0.285
7. <i>T. subcordatum</i>	197	204	82	88	80	119	-	0.067	0.158	0.094	0.123	0.154	0.254
8. <i>Lor. chinense</i>	198	203	87	84	86	118	47	-	0.159	0.106	0.133	0.159	0.257
9. <i>For. sinensis</i>	207	204	73	71	79	30	114	111	-	0.140	0.116	0.035	0.282
10. <i>C. claborescens</i>	192	200	71	74	81	106	68	74	101	-	0.116	0.137	0.271
11. <i>Syc. sinensis</i>	183	201	24	27	15	88	89	93	84	84	-	0.112	0.253
12. <i>E. oblongifolium</i>	204	207	72	72	80	30	111	111	25	99	81	-	0.283
13. <i>L. styraciflua</i>	226	221	186	182	179	206	183	180	204	196	183	205	-

18S ITS1

1 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890

D. ceroidifolius v. TCGAAACCTG CCCAGCAGAA CGACCCGCGA ACATGTATAA ACT CTCGTG GGGGAGTGGG GG GGGGGG TGCCTTCCT
R. championii TCGAAACCTG CACAGCAGAA CGACCCGCGA ACCGGT AA AC CACGTTC GGGCGGGAGC GGGGGGTGCA AGCCTTCCT
H. mollis TCGAAACCTG CCCAGCAGAA CGACCCGCGA ACACGTATCA A TGCTA-CG GGG--GCGAG GGG AGGCA TGCCTTCCT
F. major TCGAAACCTG CCCAGCAGAA CGACCCGCGA ACACGTATCA A-TGCTA-TG GGG GCGAG GGG TGGGCA TGCCTTCCT
S. subaequalis TCGAAACCTG CCCAGCAGAA CGACCCGCGA ACACGTATCA A TGCTG-CG GGG GCGAG GGG AGGCA TGCCTTCCT
Sin. henryi TCGAAACCTG CCCAGCAGAA CGACCCGCGA ACACGTAAACA A-TGCTA-TG GGG GCGAG GGG AGGCA TGCCTTCCT
T. subcordatum TCGAAACCTG CACAGCAGAA CGACCCGCGA ACACGTAAACA A CACAAGCC GGG--GCGGG GGG ATTG CTTCT
Lor. chinense TCGAAACCTG CACAGCAGAA CGACCCGCGA AChTGTAT A nmCGCCAGTC GGG GCGGG GGGGAGTTCG C'CTTCCT
Lor. sinensis TCGAAACCTG CCCAGCAGAA CGACCCGCGA ACACGTAAACA A-TGCCA-TG GGG--GCGAG GGG--AGGCA TGCCTTCCT
C. elaborescens TCGAAACCTG CCCAGCAGAA CGACCCGCGA ACACGTAAACA AATACAAGTG GGG--GCGGG GGGGAGTTCG TGCCTTCCT
Syc. sinensis TCGAAACCTG CCCAGCAGAA CGACCCGCGA ACACGTAAACA A-TGCCA-TG GGG GCGAG GGG AGGCA TGCCTTCCT
E. oblongifolium TCGAAACCTG CCCAGCAGAA CGACCCGCGA ACACGTATCA A-TGCTA-CG GGG--GCGAG GGG AGGCA TGCCTTCCT
L. styraciflua TCGATGCTG CACAGCAGAA CGACCCGCGA ACACGTATCA AAACATCGGG GGG GCG G GGGGCGCG A GTCCTTCCT

1 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111
8888888889 9999999990 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890

D. ceroidifolius v. CTCTCTCTTA CCGCTCGGGA TCGCTTCGGC -CTCGACCC GCAA-CCGT GCCCTGCGCG GGGAGCAT C GGTCTCAAC
R. championii TCTCTCTT GTCTGGGA CGCGCTCGGC ACCT--GCC GTGACCT-GC GCGATGCTG CAGGGAGC C GGTGCTGTC
H. mollis CTCTCTCTTA GTCTGGGA CGCGCTCGGT GCT-CGATCC GCGAAC-CGT GCCCTGCTG CCGG--AAGC ATCTGG CACC
F. major CACCTCTT GTCTGGGA CGCGCTCGGT GCT-CGATCC GCGAAC-CGT GCCCTGCTG CCGG--AAGC ATCTGG CACC
S. subaequalis CTCTCTCTTA GTCTGGGA CGCGCTCGGT GCT-CGATCC GCGAAC CBT GCCACGTGCG CCGG--AAGC ACCTGG CACC
Sin. henryi CACCTCTT GTCTGAGA CGCGCTCGGT GCT----- GCGAAC CBT GCCACGTGCG CCGG--AAGC ACCTGG CACC
T. subcordatum CCGCTCTT G TCGGGA CGCGCTCGGT GCT-CGCTCC GCGAAC-CGC GCGACGTGCT CCGG--AAGC CCGT CACC
Lor. chinense CACCTCTT GTCTGGGA CGCGCTCGGT GCT-CGCTCC GCGAAC CBT GCCACGTGCT CCGG--AAGC CnnGGTCTCT
Lor. sinensis CACCTCTT AGTCTGGGA CGCGCTCGGT GCT----- GCGAAC CBT GCCACGTGCT CCGG--AAGC CnnGGTCTCT
C. elaborescens CACCTCTT A TCGGGA CGCGCTCGGT GCT-CGATTA GCGAAC-CGT GCCCTGCTGCA CCGG--AAGC TTCTGG TACC
Syc. sinensis CTCTCTCTTA GCGAGA CGCGCTCGGT GCT-CGATCT GCGAAC CBT GCCACGTGCG CCGG--AAGC ACCTGG CACC
E. oblongifolium CACCTCTT GTCTGAGA CGCGCTCGGT GCT----- GCGAAC CBT GCCACGTGCG CCGG--AAGC ACCTGG CACC
L. styraciflua CTCTCTT GCGGGA AGCGCTGGGT GCG CAGCT GCTCT CBT ACCACGGGT GGGGGGAAAG GCGGTGCTT

1111111111 1111111111 1111111111 1111111112 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222
6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890

D. ceroidifolius v. G CATTCT CGAT CACA CAACGAACCC CGGCGCAAAA CGCGCAAGG AAATCTGTA CGCAAGAGCA TGAGCCCTTG
R. championii GGTGCTCT CGATACAA CAACGAACCC CGGCGCAAAA CGCGCAAGG AA-CTCTAA CGCAAGAGCA TGCCCTTTG
H. mollis GCGTGTCT CGAT CA CAACGAACCC CGGCGCAAAA CGCGCAAGG AAAC-GCAA CGCAAGAGCA TGCTT CTA
F. major GCGTGTCT CGCAT CA CAACGAACCC CGGCGCAAAA CGCGCAAGG AAAC-GCAA CGCAAGAGCA TGCTT CTA
S. subaequalis GCGTGTCT CGCAT CA CAACGAACCC CGGCGCAAAA CGCGCAAGG AAAC-GCAA CGCAAGAGCA TGCTT CTA
Sin. henryi GCGTGTCT CGCAT CA CAACGAACCC CGGCGCAAAA CGCGCAAGG AAAC-GCAA CGCAAGAGCA TGCTT CTA
T. subcordatum GTGCTGTCT CGATCT CA CAACGAACCC CGGCGCAAAA CGCGCAAGG AATC TCAA CGCAAGAGCA TGCTT CTA
Lor. chinense GTGCTGTCT CGATCT CA CAACGAACCC CGGCGCAAAA CGCGCAAGG AATC TCAA TACAAGAGCA TGCTT CTA
Lor. sinensis GCGTGTCT CGATCT CA CAACGAACCC CGGCGCAAAA CGCGCAAGG AAAC-GCAA TGCAAGAGCA TGCTT CTA
C. elaborescens GTGCTGTCT CGATCT CA CAACGAACCC CGGCGCAAAA CGCGCAAGG AATC TAAAA TGCAAGAGCA TGCTT CTA
Syc. sinensis GCGTGTCT CGCAT CA CAACGAACCC CGGCGCAAAA CGCGCAAGG AAAC-GAAA CGCAAGAGCA TGCTT CTA
E. oblongifolium GTGCTGTCT CGATCT CA CAACGAACCC CGGCGCAAAA CGCGCAAGG AAAC-GCAA TGCAAGAGCA TGCTT CTA
L. styraciflua GTGCTGTCT CGGCC CA- TAACGAACCC CGGCGCAAGC CGCGCAAGG AAAC-TCAA CGCGAGAGCA TGCGCGCCG

图 1 四药门药属及其近缘植物核糖体 DNA ITS 区与 5.8S 区序列

Fig. 1 Sequence alignment of the ITS and 5.8S regions of *Tetrathyrium* and the other related genus of Hamamelidaceae

ITS1 5. 8S									
2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	3333333333	3333333333	3333333333
4444444444	5555555555	6666666666	7777777777	8888888888	9999999999	0000000001	1111111112	1234567890	1234567890
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
<i>D. cercidifolius</i> v.	TGCCCCGT	CTCGGACGC	CCGGGGGTA	GTGCAATCTT	CGATAT -AT	CTTAACGAC	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	
<i>R. championii</i>	CTCG CCGAT	CTCGGGCGCT	GCGGGCGGCT	GTGTTATCTT	CGA - A - -AT	-CTTAACGAC	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	
<i>H. mollis</i>	TC CCCCCTG	CTCGGGTCTG	GGTGGGGCA	ATGGCATCTT	CGATAT -TAT	TCTAAACGAC	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	
<i>F. major</i>	TC CCCCCTG	CTCGGGTCTG	GGTGGGGCA	ATGGCATCTT	CGATAT -TAT	TCTAAACGAC	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	
<i>S. subaequale</i>	TC CCCCCTG	CTCGGGTCTG	GGTGGGGCG	ATGGCATCTT	CGATAT -TAT	ACTAAACGAC	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	
<i>Sin. henryi</i>	TC CCCCCTG	CTCGGGTCTG	GGTGGGGCA	ACGGCATCTT	CGATAT -TAT	TCTAAACGAC	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	
<i>T. subcordatum</i>	TC CCCCCTG	CACGGTGCC	GGTGGGGCA	ATGGCTTCTT	CGATAT -TAT	TCTAAACGAC	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	
<i>Lor. chinense</i>	TC CCCCCTG	CACGGTGCC	GGTGGGGCA	ATGGCTTCTT	CGATAT -TAT	TCTAAACGAC	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	
<i>For. sinensis</i>	TC CCCCCTG	CTCGGGTCTG	GGTGGGGCA	ATGGCATCTT	CGATAT -TAT	TCTAAACGAC	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	
<i>C. elaborescens</i>	TC CCCCCTG	CACGGTTTTT	GGTGGGGCA	ATGGCATCTT	CGATAT -TAT	TCTAAACGAC	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	
<i>Syc. sinensis</i>	TC CCCCCTG	CTCGGGTCTG	GGTGGGGCG	AAGGCATCTT	CGATAT -TAT	TCTAAACGAC	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	
<i>E. oblongifolium</i>	TC CCCCCTG	CTCGGGTCTG	GGTGGGGCA	ATGGCATCTT	CGATAT -TAT	TCTAAACGAC	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	
<i>L. styraciflua</i>	CCGCTCCGT	CTCGGGCGT	GCGGGAGCG	GTGCGATCTT	GTATCGCTAC	ACTAAACGAC	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	
3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333
2222222222	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990	1234567890	1234567890
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
<i>D. cercidifolius</i> v.	GCCTCCGAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA	
<i>R. championii</i>	GCCTCCGAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA	
<i>H. mollis</i>	GCCTCCGAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	nnnnnnnnnn	
<i>F. major</i>	GCCTCCGAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA	
<i>S. subaequale</i>	GCCTCCGAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA	
<i>Sin. henryi</i>	GCCTCCGAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA	
<i>T. subcordatum</i>	GCCTCCGAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	nnnnnnnnnn	
<i>Lor. chinense</i>	GCCTCCGAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	nnnnnnnnnn	
<i>For. sinensis</i>	GCCTCCGAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA	
<i>C. elaborescens</i>	GCCTCCGAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA	
<i>Syc. sinensis</i>	GCCTCCGAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA	
<i>E. oblongifolium</i>	GCCTCCGAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA	
<i>L. styraciflua</i>	GCCTCCGAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA	
5. 8S' ITS2									
4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444
0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
<i>D. cercidifolius</i> v.	ACGCAAGTTG	CGCCGAAGC	CATTAGGCCG	AGGGCACGTC	TGCCGTGGCG	TCACGTATCG	CGTGCACCXX	CCAA CXXX	
<i>R. championii</i>	ACGCAAGTTG	CGCCGAAGC	CATTAGGCCG	AGGGCACGTC	TGCCGTGGCG	TCACGTATCG	CGTGCACCXX	CCAA CXXX	
<i>H. mollis</i>	nnnnnnnnTTG	CGCCGAAGC	CATTAGGCCG	AGGGCACGTC	TGCCGTGGCG	TCACGTATCG	CGTGCACCXX	CCAA CXXX	
<i>F. major</i>	ACGCAAGTTG	CGCCGAAGC	CATTAGGCCG	AGGGCACGTC	TGCCGTGGCG	TCACGTATCG	CGTGCACCXX	CCAA CXXX	
<i>S. subaequale</i>	ACGCAAGTTG	CGCCGAAGC	CATTAGGCCG	AGGGCACGTC	TGCCGTGGCG	TCACGTATCG	CGTGCACCXX	CCAA CXXX	
<i>Sin. henryi</i>	ACGCAAGTTG	CGCCGAAGC	CATTAGGCCG	AGGGCACGTC	TGCCGTGGCG	TCACGTATCG	CGTGCACCXX	CCAA CXXX	
<i>T. subcordatum</i>	ACGCAAGTTG	CGCCGAAGC	CATTAGGCCG	AGGGCACGTC	TGCCGTGGCG	TCACGTATCG	CGTGCACCXX	CCAA CXXX	
<i>Lor. chinense</i>	ACGCAAGTTG	CGCCGAAGC	CATTAGGCCG	AGGGCACGTC	TGCCGTGGCG	TCACGTATCG	CGTGCACCXX	CCAA CXXX	
<i>For. sinensis</i>	ACGCAAGTTG	CGCCGAAGC	CATTAGGCCG	AGGGCACGTC	TGCCGTGGCG	TCACGTATCG	CGTGCACCXX	CCAA CXXX	
<i>C. elaborescens</i>	ACGCAAGTTG	CGCCGAAGC	CATTAGGCCG	AGGGCACGTC	TGCCGTGGCG	TCACGTATCG	CGTGCACCXX	CCAA CXXX	
<i>Syc. sinensis</i>	ACGCAAGTTG	CGCCGAAGC	CATTAGGCCG	AGGGCACGTC	TGCCGTGGCG	TCACGTATCG	CGTGCACCXX	CCAA CXXX	
<i>E. oblongifolium</i>	ACGCAAGTTG	CGCCGAAGC	CATTAGGCCG	AGGGCACGTC	TGCCGTGGCG	TCACGTATCG	CGTGCACCXX	CCAA CXXX	
<i>L. styraciflua</i>	ACGCAAGTTG	CGCCGAAGC	CATTAGGCCG	AGGGCACGTC	TGCCGTGGCG	TCACGTATCG	CGTGCACCXX	CCAA CXXX	

图 1 续

Fig. 1 Continued

	444444444	444444445	555555555	555555555	555555555	555555555	555555555	555555555	555555555
	888888888	999999999	000000001	111111112	222222223	333333334	444444445	555555556	
	123456789	123456789	123456789	123456789	123456789	123456789	123456789	123456789	
<i>D. cercidifolius</i> v.	G	CACCGAT	CCCGTGGTG	GTGGCTTT	ATGTGGGGG	GGATACTGG	CTCCGTGA	CTTCGGGT	GCGGTGGCT
<i>R. championii</i>	ATCCACGTTG	CTCGTGGTG	GGGG	ATTG	A	CGGAG	C	GGATATTGGT	CTCCGTGA
<i>H. mollis</i>	G	CACGTAT	ACCGTGCCG	GGGGCAT	-C	ATGTGGGGG	GGATATTGG	CTCC	CGTG
<i>F. major</i>	GCCACGAT	ATCGTGCCG	GGGGCT	-C	ATGTGGGGG	GGATATTGG	CTCC	CGTG	C
<i>S. subaquale</i>	GCCACGAT	GCCGTGATG	GGGGCT	C	CTGTGGGGG	GGATATTGG	CTCC	CGTG	C
<i>Sin. henryi</i>	TCCACGTAT	ATCGTGCTG	GTGGATTAT	ATGTGGGGG	GGAGATTGG	CTCC	CGTG	C	CTTCGG
<i>T. subcordatum</i>	GCCACGAA	GCCGTGGTG	GGGGCAT	C	GTGGGGGG	GGATACTGG	CTCC	CGTG	C
<i>Lor. chinense</i>	TCCACGAC	GCCGTGGTA	TGGGCG	C	ATGTGGGGG	GGAGATTGG	CTCC	CGTG	C
<i>Por. sinensis</i>	GCACACGTAC	ACCGTGAGA	GGGGATTAT	ATGTGGGGG	GGAGATTGG	CTCC	CGTG	C	CTTCGG
<i>C. elaborescens</i>	GCCACGTCC	GACGTGGTG	GGGGCAT	T	ATGTGGGGG	GGATATTGG	CTCC	CGTG	C
<i>Syc. sinensis</i>	TCACACGTAT	ATCGTGATG	GGGGCT	C	CTGTGGGGG	GGATATTGG	CTCC	CGTG	C
<i>E. oblongifolium</i>	GCCACGTAT	ATCGTGAGA	GGGGCAT	AC	ATGTGGGGG	GGATATTGG	CTCC	CGTG	C
<i>L. styraciflua</i>	GCCGCTTC	G	GTGGCG	GGGGCTTC	G	GGAGC	GGAGATTGG	CTCC	GTAA
	555555555	555555555	555555555	555555555	666666666	666666666	666666666	666666666	666666666
	666666667	777777778	888888889	999999999	000000001	111111112	222222223	333333334	
	123456789	123456789	123456789	123456789	123456789	123456789	123456789	123456789	
<i>D. cercidifolius</i> v.	TAAAAAGCAG	CCCGAGGCT	C	GAACGTCA	CG	AC	AAGTGGTGGT	TGTTAA	CC
<i>R. championii</i>	TAAAAATCGG	TCCCGAGCA	C	GAACGTCA	CG	AC	AAGTGGTGGT	TGACAGGCT	CGGCTCAG
<i>H. mollis</i>	TAAAAGCGAG	CCCGGGGCA	CAGA		ACGTCACGAT	AAGTGGTGGT	TGATAAGCC	CGGC	CTTG
<i>F. major</i>	TAAAAGCGAG	CCCGGGGCA	CAGA		ACGTCACGAT	AAGTGGTGGT	TGATAAGCC	CGGC	CTTG
<i>S. subaquale</i>	TAAAAGCGAG	CCCGGGGCA	CAGA		ACGTCACGAT	AAGTGGTGGT	TGATAAGCC	CGGC	CTTG
<i>Sin. henryi</i>	TAAAAGAGAG	CCCGGGGCA	CAGA		ACGTCACGAT	AAGTGGTGGT	TGATAAGCC	CGGC	CTTG
<i>T. subcordatum</i>	TAAAAGCGAG	CCCGGGGCA	CAGA		ACGTCACGAT	AAGTGGTGGT	TGATAAGCC	CGGC	CTTG
<i>Lor. chinense</i>	TAAAAGCGAG	CCCGGGGCA	CAGA		ACGTCACGAT	AAGTGGTGGT	TGATAAGCC	CGGC	CTTG
<i>Por. sinensis</i>	TAAAAGCGAG	CCCGGGGCA	CAGA		ACGTCACGAT	AAGTGGTGGT	TGATAAGCC	CGGC	CTTG
<i>C. elaborescens</i>	TAAAAGCGAG	CCCGGGGCA	CAGA		ACGTCACGAT	AAGTGGTGGT	TGATAAGCC	CGGC	CTTG
<i>Syc. sinensis</i>	TAAAAGCGAG	CCCGGGGCA	CAGA		ACGTCACGAT	AAGTGGTGGT	TGATAAGCC	CGGC	CTTG
<i>E. oblongifolium</i>	TAAAAGCGAG	CCCGGGGCA	CAGA		ACGTCACGAT	AAGTGGTGGT	TGATAAGCC	CGGC	CTTG
<i>L. styraciflua</i>	TAAAAGCGTG	CCCGGGGCA	CGAA	CGCA	ACGTCCTAAG	CAGTGGTGGT	TAGCAAAAC	CGGCATCGAC	GATGT
	666666666	666666666	666666666	666666666	666666666	666666666	666666667	777777777	7777
	144444445	555555556	666666667	777777778	888888889	999999999	000000001	111111112	2222
	123456789	123456789	123456789	123456789	123456789	123456789	123456789	123456789	1234
<i>D. cercidifolius</i> v.	G	CGT	TGTCCTGTC	CTCGTGGTG	CTGC	GTGAC	CCCG	ATGC	TCCGTGGAAT
<i>R. championii</i>	G	TGTCGCT	TTCCTGTC	CTCGTGGTG	CGAACGAGAC	CCCG	ATGC	GTGCTCC	ACGGATGCTT
<i>H. mollis</i>	GT	CTGCTGT	TGCTCTGTC	CTCGTGGTG	CTA	CGAGAC	CCCGAT	GC	GTGCTCC
<i>F. major</i>	GT	CTGCTGT	TGCTCTGTC	CTCGTGGTG	CTA	CGAGAC	CCCGAT	GC	GTGCTCC
<i>S. subaquale</i>	GT	CTGCTGT	TGCTCTGTC	CTCGTGGTG	CTA	CGAGAC	CCCGAT	GC	GTGCTCC
<i>Sin. henryi</i>	GT	CTGCTGT	TGCTCTGTC	CTCGTGGTG	CTA	CGAGAC	CCCGAT	GC	GTGCTCC
<i>T. subcordatum</i>	GT	CTGCTGT	TGCTCTGTC	CTCGTGGTG	CTA	CGAGAC	CCCGAT	GC	GTGCTCC
<i>Lor. chinense</i>	GT	CTGCTGT	TGCTCTGTC	CTCGTGGTG	CTA	CGAGAC	CCCGAT	GC	GTGCTCC
<i>Por. sinensis</i>	GT	CTGCTGT	TGCTCTGTC	CTCGTGGTG	CTA	CGAGAC	CCCGAT	GC	GTGCTCC
<i>C. elaborescens</i>	GT	CTGCTGT	TGCTCTGTC	CTCGTGGTG	CTA	CGAGAC	CCCGAT	GC	GTGCTCC
<i>Syc. sinensis</i>	GT	CTGCTGT	TGCTCTGTC	CTCGTGGTG	CTA	CGAGAC	CCCGAT	GC	GTGCTCC
<i>E. oblongifolium</i>	GT	CTGCTGT	TGCTCTGTC	CTCGTGGTG	CTA	CGAGAC	CCCGAT	GC	GTGCTCC
<i>L. styraciflua</i>	CT	TGTCGCT	TGCTCTGTC	CCG	AGAC	ACAGAGACC	CGTAAC	GC	GTGCTCC

图 1 续

Fig. 1 Continued

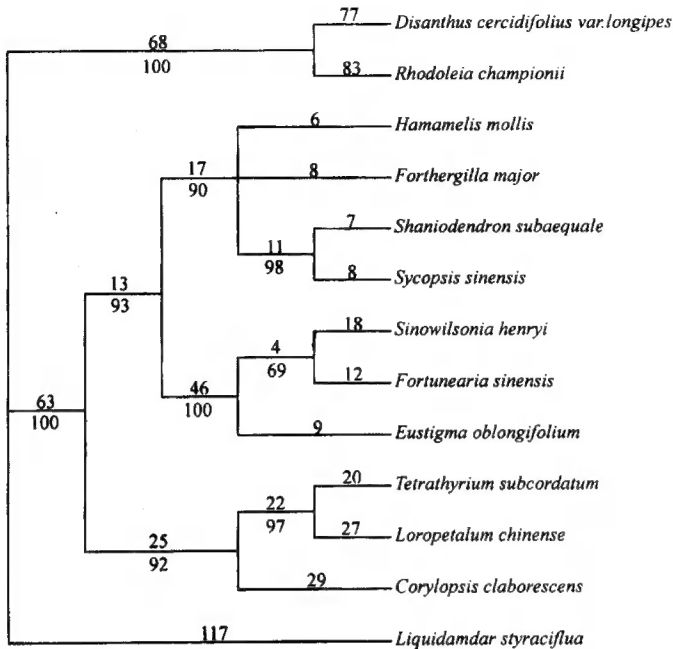


图 2 金缕梅亚科严格一致系统树，线上的数字代表分支长度；线下的数字代表各分支的自展数据支持率（100 次抽样重复的 bootstrap 值）

Fig. 2 The strict consensus tree of the two most parsimonious trees of Hamamelidoideae based on the ITS sequences of nrDNA (690 steps, CI = 0.775, RI = 0.670, RC = 0.520). The numbers above the lines indicate branch lengths. Bootstrap values in 100 replicated were indicated below each branch

2 结果

测序结果列于图 1 中。总长 724bp 的序列分析表明，在金缕梅亚科内 ITS 区总长度 (ITS-1 和 ITS-2) 为 473 ~ 507bp。5.8S 区长度在 164 ~ 165bp。令人注意的是，牛鼻栓 (*Fortunearia sinensis*)、山白树 (*Sinowilsonia henryi*)、秀柱花 (*Eustigma oblongifolium*) 同时存在一段长达 38bp 的缺失。用 PAUP 3.1.1 获得各类群的核苷酸差异数及 Knuc 值列于表 2 中。可以看出；在金缕梅亚科内，Knuc 值变化范围为 2.0% (*Fothergilla* 与 *Hamamelis* 之间) 到 17.2% (*Loropetalum* 与 *Sinowilsonia* 之间)。亚科内的 Knuc 值均小于 20%；而亚科间的 Knuc 值均大于 20%，即从 22.1% (*Disanthus* 与 *Rhodoleia* 之间) 到 31.2% (*Disanthus* 与 *Liquidambar* 之间)。这从一个方面显示了金缕梅科内各亚科之间的相对独立性以及金缕梅亚科内复系演化 (polyphyletic) 的特征。在此基础上，通过分支分析获得 2 棵最大简约树 (MPTs)，其严格一致树 (Strict Consensus Tree) 以及各分支长度和各分支的自展数据支持率见图 2。

3 讨论

ITS 系统树表明，实验所测定的金缕梅亚科的所有种类形成一个单系类群 (monophyletic group)，这一结果得到了 100% 的自展数据值的支持 (图 2)。而在亚科内的类群间

则表现为复系演化 (polyphyletic) 特征。事实上, 金缕梅亚科内的系统演化关系一直存在着较大的争议 (张宏达, 1979; Bogle, 1970; Hams, 1930)。Endress (1989) 根据形态学特征将该亚科划分为 4 个族: 金缕梅族 (Hamamelideae), 蜡瓣花族 (Corylopsideae), 秀柱花族 (Eustigmateae), 弗特吉族 (Fothergilleae)。Endress 将 Eustigmateae 这一单属的族扩展为 3 个属: *Eustigma*, *Fortunearia* 和 *Sinowilsonia*。在本研究所得到的 ITS 系统树中, 这 3 个属为姐妹群, 形成一个单系分支 (自展数据支持率为 100%, 图 2)。此结果支持将传统分类中属于 Corylopsideae 的 *Fortunearia* 以及 Fothergilleae 的 *Sinowilsonia* 归入 Eustigmateae 的观点。此外, 在整个金缕梅科的核糖体 DNA ITS 区序列中, 唯有这 3 个属在 ITS-1 区存在一段 38bp (114 位 ~ 151 位) 的碱基缺失 (图 1), 这一特征从另一侧面反映了这 3 个属的关系密切, 进一步支持了该族成立的观点。

Endress (1989) 在其系统中, 根据形态学和遗传学的证据, 将蚊母树族 (Distyliaceae) 归并入 Fothergilleae。ITS 区序列的系统树表明, Distyliaceae 的 *Sycopsis* 与 Fothergilleae 的 *Shaniodendron* 形成一个单系类群 (自展数据集支持率为 98%, 图 2)。两者之间的 ITS 序列差异值也较低, 仅为 2.1% (表 2), 这一结果再一次支持 Distyliaceae 与 Fothergilleae 合并的观点 (Endress, 1989, 李建华等, 1997)。ITS 序列分析的结果还表明, *Shaniodendron* 与 *Sycopsis*, *Fothergilla* 和 *Hamamelis* 这 3 个属的关系较近, 所构成的姐妹群关系也获得了 90% 的自展数据支持率。*Shaniodendron* 是 1992 年新建立的单种属 (邓懋彬等, 1992), 根据 *Shaniodendron* 缺少花瓣等形态学特征, 有人建议将它放入金缕梅亚科中的无花瓣类群 (郝日明等, 1996), 即归入 Fothergilleae。本研究的结果与这一观点较为接近。

从本研究所得到的 ITS 系统树还可以看出, *Hamamelis* 与 Fothergilleae 也有着较为亲近的系统发育关系。*Hamamelis* 与 *Fothergilla*, *Shaniodendron* 和 *Sycopsis* 这 3 个属间的核苷酸差异值相当小 (2.0% ~ 3.4%), 为该属与本亚科中其它属的 Knuc 值中最小的。在系统树中表现为同一姐妹群关系 (图 2)。从 *Hamamelis* 与另外两个族 (Eustigmateae 和 Corylopsideae) 的关系来看, 该属与 Eustigmateae 关系较近, 而与 Corylopsideae 关系较远, 这与解剖学及形态学的结论相一致 (张宏达, 1995)。

值得注意的是, 在本研究的 ITS 系统树中, Hamamelideae 内部也同样表现出复系演化的特征。Endress (1989) 将 Hamamelideae 划分为 3 个亚族: 金缕梅亚族 (Hamamelidinae)、榧木亚族 (Loropetalinae) 和 Dicoryphinae。*Tetrathyrium* 与 *Loropetalum* 同属于 Loropetalinae。本研究的结果表明, *Tetrathyrium* 与 *Loropetalum* 形成一个单系类群 (97% 的自展数据支持率) (图 2), 因而支持将它们归入同一亚族的观点。另一方面, ITS 系统树还表明, *Tetrathyrium*, *Loropetalum* 与同一族的 *Hamamelis* 之间却关系甚远, 它们之间的核苷酸差异值较 *Hamamelis* 与金缕梅亚科其它属的差异都更大 (为 11.7% ~ 12.6%, 表 2) 它们各自与不同的族 (Fothergilleae 与 Corylopsideae) 形成姐妹群关系。形态发育学的证据曾表明 *Hamamelis* 与 *Loropetalum* 的花器官在个体发育上差异很大 (Miore *et al*, 1987)。张宏达 (1962) 认为在解剖学及形态学上, *Tetrathyrium* 是金缕梅亚科中最原始的一个属。他认为 *Loropetalum* 和 *Tetrathyrium* 非常接近, 也是本亚科中较原始的类群。而 *Hamamelis* 在系统发育上则比以上 2 个属处于较进化的位置, 本研究的结果支持了上述结论。此意味着 *Tetrathyrium* 和 *Loropetalum* 所组成的 Loropetalinae 与 Hamamelidinae (只含 *Hamamelis*) 同归

入 Hamamelideae 的意见得不到核糖体 DNA ITS 序列分析结果的支持。另外, 在 ITS 系统树图中, Loropetalinae 与 Corylopsideae 表现为姐妹群关系 (Branch length 为 29, 图 2)。虽然两者在解剖学上都具有非常原始的次生木质部, 导管多梯形穿孔, 木薄壁组织贫乏等, 具有一定的相似性, 但是两者在花的形态上明显不同 (Weaver, 1976)。在本研究的 ITS 序列中, Loropetalinae 与 Corylopsideae 的核苷酸差异值也较大 (9.4% ~ 10.6%, 表 2), 因此 Loropetalinae 能否归入 Corylopsideae 仍然需要更深入的研究。从另外一个角度来看, Loropetalinae 和 Hamamelidinae 在分子系统树中的位置可能反映了它们在进化中的不同地位。与形态解剖学上的证据相一致 (张宏达, 1995), Loropetalinae 代表了原始的类群从而接近 Corylopsideae; 而 Hamamelidinae 则代表了相对更进化的类群而靠近 Fothergilleae。因此, 将两者同放在 Hamamelideae 中这一意见有待于商榷。比较而言, 将 Loropetalinae 另立为一族更能得到分子数据的支持。总之, 金缕梅亚科中 Hamamelideae 的界限是一个很值得深入探讨的问题。进一步的研究可以围绕两个方面来进行, 一是扩大样品的种类, 引入该族其它属的 ITS 数据; 二是与其它分子标记 (如叶绿体 DNA *matK* 基因等) 相结合来共同探讨。

致谢 本研究承中科院华南植物研究所邢福武、刘念研究员, 南京林业大学李湘萍老师, 江苏植物研究所郝日明先生提供部分实验材料。

参考文献

- 邓懋彬, 魏宏图, 王希冀, 1992. 银缕梅属——中国金缕梅一新属. 植物分类学报, **30** (1): 57 ~ 61
- 李建华, Bogle A L, Klein A S, *et al*, 1997. 金缕梅科银缕梅属与帕罗堤属的亲缘关系—核糖体 DNA ITS 序列证据. 植物分类学报, **35** (6): 481 ~ 493
- 张宏达, 1962. 广东植物区系的特点. 中山大学学报 (自然科学版), **1**: 35 ~ 44
- 张宏达, 1979. 金缕梅科. 中国植物志 35 卷第 2 分册. 北京: 科学出版社, 36 ~ 116
- 张宏达, 王伯荪, 胡玉佳等, 1989. 香港植被. 中山大学学报论丛, **8** (2): 113 ~ 117
- 张宏达, 1995. 金缕梅科的植物区系分析. 见: 《张宏达文集》编辑组编辑. 张宏达文集. 广州: 中山大学出版社, 188 ~ 196
- 郝日明, 魏宏图, 刘晚苟, 1996. 银缕梅属花形态及其分类学意义. 植物资源与环境, **5** (1): 38 ~ 42
- Bogle A L, 1970. Floral morphology and vascular anatomy of the Hamamelidaceae: the apetalous genera of Hamamelidaceae. *J Arnold Arbor*, **51**: 330 ~ 366
- Doyle J J, Doyle J L, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochem Bull*, **19**: 11
- Endress P K, 1989. A suprageneric taxonomic classification of the Hamamelidaceae. *Taxon*, **38** (3): 371 ~ 376
- Harms H, 1930. Hamamelidaceae. In: Engler A and Prantl K, eds. Die Natürlichen Pflanzenfamilien. Band 18a. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann, 303 ~ 345
- Mione T, Bogle A L, 1987. Comparative ontogeny of the flowers of *Hamamelis virginiana* and *Loropetalum chinense* (Hamamelidaceae). *Am J Bot*, **74**: 620 ~ 621
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A R, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**: 5463
- Shi S H, Chang H T, Chen Y Q *et al*, 1998. Phylogeny of the Hamamelidaceae based on the ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Biochem Syst Evol*, **25**: 55 ~ 69
- Swofford D L, 1993. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 3. 1. 1. Illinois Natural History Survey. Champaign. IL.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F *et al*, 1997. The Clustalx windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, **25** (24): 4876 ~ 4882
- Weaver R E Jr., 1976. The witch hazel family (Hamamelidaceae). *Arnoldia*, **36** (3): 69 ~ 109
- Wen J, Zimmer E A, 1996. Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the ginseng genus, Araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Mol Phylogenet Evol*, **6**: 166 ~ 177